# WELTORGANISATION FUR GEISTIGES EIGENTUM



# Internationales Büro INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation 7: A61K 51/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungs (43) Internationales Veröffentlichungsdatum:		WO 00/45857
(21) Internationales Aktenzeichen: (22) Internationales Anmeldedatum: 21. Ja	PCT/EPO		CN, CR, CU, CZ, DM, EE,	ES, FI, GE	B, GD, GE, GH, GM,

- (30) Prioritätsdaten:
  - 199 05 094.5

1. Februar 1999 (01.02.99)

DE

- (71) Anmelder: SCHERING AKTIENGESELLSCHAFT [DE/DE]: Müllerstrasse 178, D-13342 Berlin (DE).
- (72) Erfinder: LAWACZECK, Rudiger; Beyschlagstrasse 8c, D-13503 Berlin (DE). PLATZEK, Johannes; Grottkauer Strasse 55, D-12621 Berlin (DE). RADÜCHEL, Bernd; Gollanczstrasse 132, D-13465 Berlin (DE).

LT, LV, MA, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, SD, SG, SI, SK, SL, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW, eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT,

#### Veröffentlicht

Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.

- (54) Title: METAL MACROCYCLES FOR TWO-STEP FORMS OF RADIOTHERAPY
- (54) Bezeichnung: METALLMAKROZYKLEN FÜR ZWEISCHRITT-STRAHLENTHERAPIEFORMEN
- (57) Abstract

The invention relates to the use of at least one physiologically compatible compound of general formula (I), wherein U represents -CH2-CH(OH)-CH2- or -CHR-CO-NH-(CH2)n-CO, with R meaning a hydrogen atom or a methyl group and n meaning the numbers 1 to 10, and T represents a tumour-specific radical of biological or synthetic origin, for producing preparations for neutron capture and photon activation therapy.

#### (57) Zusammenfassung

Es wird die Verwendung von mindestens einer physiologisch verträglichen Verbindung der allgemeinen Formel (I), worin U für -CH2-CH(OH)-CH2- oder -CHR-CO-NH-(CH2)n-CO mit R in der Bedeutung eines Wasserstoffatoms oder einer Methylgruppe und n in der Bedeutung der Ziffern 1 bis 10, und T für einen tumorspezifischen Rest biologischen oder synthetischen Ursprungs stehen, für die Herstellung von Präparaten für die Neutroneneinfang- und Photonenaktivierungstherapie beschrieben.

# LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

1			•				
AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
ΑU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland		Republik Mazedonien .	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungam	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		Amerika
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik	NZ	Neusceland	zw	Zimbabwe
CM	Kamerun		Korea	PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	РΤ	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

### Metallmakrozyklen für Zweischritt-Strahlentherapieformen

Die Neutronen-Einfang-Therapie (NET) ist eine Zweischritt-Therapie, die darin besteht, physiologisch verträgliche Substanzen in ein Zielgebiet einzutragen und dann im zweiten Schritt durch Aktivierung mit Neutronen in die Wirksubstanzen zu überführen. Der Vorteil dieser Therapapieform liegt darin, daß nur dort, wo die Substanz aktiviert wird, sich das Wirkprofil der Substanz entfaltet. Ohne den lokal steuerbaren Anschaltschritt bleibt die Substanz inaktiv. Ein ähnlicher Mechanismus gilt für die Photonenaktivierungstherapie (PAT).

Im Falle der Aktivierung durch Neutronen sind zwei Isotope durch besonders hohe Einfangquerschnitte für thermische Neutronen ausgezeichnet: dies sind <sup>10</sup>Bor und <sup>157</sup>Gadolinium, die mit natürlicher Häufigkeit von 20 % und 16 % vorkommen.

15

20

Im Fall der Photonenaktivierung werden Substanzen verwendet, die Elemente enthalten, die Röntgenstrahlen absorbieren können. Das sind Elemente mit höheren Ordnungszahlen, die über den photoelektrischen Effekt Röntgen-Photonen unter Aussendung von Auger-Elektronen oder Röntgenfluoreszenz-Photonen absorbieren.

Nach Neutroneneinfang zerfällt Bor in ein α-Teilchen und <sup>7</sup>Li, beide haben Reichweiten von weniger als 10 μm - also in der Größenordnung von Zelldurchmessern - so daß zur Ausbildung einer Zellschädigung der Borzerfall intrazellulär erfolgen sollte. <sup>157</sup>Gd wird nach Neutroneneinfang in <sup>158</sup>Gd überführt, zusätzlich werden eine γ-Strahlung und Konversions- sowie Augerelektronen freigesetzt. Die γ-Strahlung hat große Reichweiten, die Reichweite der Konversionselektronen liegt bei 50 - 70 μm, die über die Auger-Kaskade freigesetzten Elektronen haben nur kurze Reichweiten von wenigen nm. Während die γ-Strahlung und die Konversionselektronen zur eingetragenen

-2-

Dosis beitragen, kommt für Gd-Komplexe, die nicht unmittelbar in DNA Nähe plaziert sind, ein zellschädigender Effekt der Auger-Elektronen nicht zum Zuge.

Zur Entfaltung des vollen Wirkspektrums sollten die Gd-Komplexe wie auch die B-Substanzen intrazellulär aufgenommen sein und sich möglichst nahe der DNA, dem radiobiologischen Ziel, befinden.

Chemisch verhalten sich Bor und Gadolinium sehr unterschiedlich. Bor erlaubt die Ausbildung kovalenter Bindungen, Gadolinium liegt als komplexiertes Ion vor. Zahlreiche Borverbindungen sind bekannt und, weil es bei der Neutronen-10 Einfang-Therapie auf die Anzahl der Boratome ankommt, hat man für diesen Zweck eine Reihe von Borclustern entwickelt, die man in geeigneter Weise an biologische Moleküle, wie z.B. Porphyrine (BOPP) [LR Huang, RM Straubinger, SB Kahl, MS Koo, JJ Alletto, R Mazurchuk, RI Chau, SL Thamer, RJ Fiel. Boronated metalloporphyrins: a novel approach to the diagnosis and treatment 15 of cancer using contrast-enhanced MR imaging and neutron capture therapy. JMRI 3: 315-356 (1993)]), koppeln kann. Befruchtend auf die Chemie der Lanthanidkomplexe hat die Tatsache gewirkt, daß aufgrund der magnetischen Eigenschaften insbesondere Gd3+ bevorzugt als Kontrastmittel in der MR Tomographie eingesetzt werden kann. Für die Komplexierung der Lanthanidionen 20 haben sich sowohl offenkettige, wie z.B. DTPA (Diethylentriaminpentaessigsäure), als auch zyklische Komplexbildner, wie z.B. DOTA, bewährt. Im zweiten Fall wird das dreiwertige Gd3+ durch die vier Stickstoffatome und die Säurereste sehr stark komplexiert. Im Gegensatz zu den offenkettigen Komplexen ist die Stabilität der zyklischen Komplexe größer und auch weniger pH-anfällig. Das ist deshalb wichtig, weil es im Zellinneren Kompartimente mit sehr niedrigem pH (pH 5) geben kann.

Der Vorteil der Borsubstanzen für die NET liegt in dem hohen linearen

30 Energietransfer (LET) dieser Substanzen. Es kommt leicht zum Zelltod, wenn die Borsubstanz intrazellulär vorliegt und die Spaltprodukte dort freigesetzt

-3-

werden. Der Nachteil der Borsubstanzen ist in der mangelnden Analytik zu sehen. Bor hat kein handhabbares radioaktives Isotop, die chemische Boranalyse ist wenig sensitiv, <sup>11</sup>B NMR ist möglich, aber aufwendig. Bor wird sensitiv nur über die Fissionsreaktion mit thermischen Neutronen nachgewiesen, das ist on-line in vivo nicht möglich. Von Gadolinium stehen geeignete radioaktive Isotope, einschließlich für PET, zur Verfügung. Gd hat die Ordnungszahl 64 und ist damit gegenüber dem leichten Bor röntgendicht.

Hinsichtlich der Borsubstanzen hat man sich klinisch auf zwei Substanzen konzentriert: BSH und BPA. BSH ist ein Borcluster und BPA (p-Boronophenylalanin) ist dem Tyrosin sehr ähnlich, es kann über den Transportmechanismus für aromatische Aminosäuren intrazellulär aufgenommen werden und wird bei der Behandlung von malignen Melanomen eingesetzt. Beide Substanzen werden intrazellulär aufgenommen.

Ausschlaggebend für den therapeutischen Erfolg ist die Kenntnis der Pharmakokinetik, insbesondere sollten auf individueller Basis die Tumoranreicherung und die Bluthalbwertszeit bekannt sein, da nur dann eine tolerierbare Bestrahlung möglich ist, wenn die Konzentration im Blut dies erlaubt. Wegen der Kompliziertheit der Boranalytik hat man schon früh überlegt, Borsubstanzen mit geeigneten Radiodiagnostika zu verbinden. So wurde ein PET-aktives <sup>18</sup>F-BPA entwickelt [Y Mishima. Selective thermal neutron capture therapy of cancer cells using their specific metabolic activities - melanoma as prototype. Cancer Neutron Capture Therapy (Y Mishima, Ed.) Plenum Press

25

30

New York 1996, 1-26].

15

20

Die Bedeutung des Bors für die Neutronen-Einfang-Therapie wurde früh erkannt, und zahlreiche Borverbindungen sind Gegenstand von Patentanmeldungen. So beschreibt WO 95/15333 Konjugate aus Oligonucleotiden und Carboranen als Wirkstoff für die NET. In dem US-Patent 5,466,679 werden Carborane an Nucleoside geknüpft für die NET beschrieben. Die US-Patentschrift 5,455,022 beschreibt Sulfidohydroborane für die NET.

-4-

Auch Porphyrine werden als Träger für Carborane verwendet, siehe US-Patent 5,654,423 und WO 95/09856. In der Europäischen Anmeldung EP 205326 werden Antikörper als Bindungspartner für Carborane für die NET genannt.

5

10

Man hat auch daran gedacht, Borsubstanzen und Gd-Komplexe in einem Molekül zu vereinen. Diese Kombination kann in zweifacher Hinsicht sinnvoll sein: sie verknüpft die therapeutischen Vorteile beider Substanzen und ermöglicht über die MR Diagnostik die Bestimmung der Pharmakokinetik, so daß der Zeitpunkt der Bestrahlung optimiert werden kann. So wurden B-Gd-Substanzen bereits beschrieben [Spielvogel & Sood. US Patent 5,286,853, Rowland et al., A new approach to the design of blood pool contrast agents. SMRM 1996; Yamamoto et al., A new synthetic method of all carboxylate-free DTPA derivatives and its application to the synthesis of Gd-carborane complex. Advances in Neutron Capture Therapy II, 436-439 (1997)]. Rowland et al. und Yamamoto et al. verwenden wie die Mehrheit der Autoren DTPA zum Komplexieren von Gd und verknüpfen BPA oder Borcluster mit dem Grundgerüst, Spielvogel & Sood beziehen sich auf die makrozyklische DOTA

20

Die bisher beschriebenen Verbindungen zeigen jedoch Eigenschaften, die sie für eine Anwendung am Menschen ungeeignet machen:

Struktur und benutzen eine Seitenkette zum Anheften z.B. eines Borkäfigs.

- geringe Verträglichkeit
- chemische Instabilität
  - Instabilität der Komplexe
  - unvollständige Ausscheidung
  - unzureichende Wasserlöslichkeit.
- Es bestand daher weiterhin ein Bedarf an für die NET und PAT geeigneten Verbindungen.

Es wurde nun gefunden, daß überraschenderweise die erfindungsgemäßen Verbindungen der Formel I diese Nachteile nicht aufweisen:

5 worin

10

U für – $CH_2$ -CH(OH)- $CH_2$ - oder –CHR-CO-NH- $(CH_2)_n$ -CO mit

R in der Bedeutung eines Wasserstoffatoms oder einer Methylgruppe und

n in der Bedeutung der Ziffern 1 bis 10, und

T für einen tumorspezifischen Rest biologischen oder synthetischen Ursprungs stehen.

Vorzugsweise steht n für die Ziffer 1.

- Als bevorzugter Rest biologischen Ursprungs steht T für ein(e) um eine Aminooder Hydroxylgruppe vermindertes Hormon, Vitamin, Polysaccharid, Steroid, Lipid, Fettsäure, Peptid, Lektin, Nukleotid, Nukleosid, Antibiotikum, Antitumormittel, Porphyrin und biogenes Amin oder deren Derivate.
- Als bevorzugter Rest synthetischen Ursprungs steht T für ein um ein Wasserstoffatom, eine Amino- oder Hydroxylgruppe verminderten(s) Farbstoff, Antibiotikum, Antitumormittel, DNA-Interkalator, synthetisches Steroid und Phenylboronsäure oder deren Derivate.

5

Besonders bevorzugte Reste T biologischen Ursprungs sind Progesteron, Estradiol, Biotin, Folsäure, Liponsäure, Ascorbinsäure, Vitamin K, Vitamin B12, Maltotetraose, Lewis-X, Chitosan, Cholesterin, Cholsäure, Phosphatidylbispalmitoyl-glycerin, Stearinsäure, Palmitinsäure, Somatostatin, VEGF,

Doxorubicin, Adriamycin, Bleomycin, Taxol, Dientrien-Antibiotikum, Epothilon, Hämatoporphyrin, Mesoporphyrin, Spermidin, Tryptamin und Histamin.

Als bevorzugter Rest synthetischen Ursprungs steht T für Methylblau, AcridinOrange, Texaphyrin, Cephalosporin, Carbacyclin, Cis-Platinderivate,
Cyclophosphamid, Acridine, Psoralene, Cyproteronacetat, RU-486,
Phenylalanin-4-boronsäure, Borcluster und Carboran.

Die erfindungsgemäßen Verbindungen der allgemeinen Formel I werden durch
Umsetzung von Verbindungen der allgemeinen Formel II

$$O \longrightarrow N \qquad O \qquad O \qquad O \qquad (II),$$

mit Aminen der allgemeinen Formel (III)

$$H_2N-T$$
 (III)

20

unter den z.B. in der DE 196 52 386 beschriebenen Reaktionsbedingungen oder durch Umsetzung von Verbindungen der allgemeinen Formel IV

10

15

mit Verbindungen der allgemeinen Formel V X-T (V),

worin X für eine Fluchtgruppe wie z.B. Hydroxyl, Chlorid, Bromid, Iodid, Tosylat,
Mesylat und Triflat steht, erhalten. Die Umsetzung erfolgt im Falle, daß X für
eine Hydroxylgruppe steht - wobei die OH-gruppe an eine in T enthaltene
Carbonylgruppe gebunden ist – nach dem Fachmann bekannten Verfahren der
Herstellung von Carbonsäureamiden wie sie z.B. beschrieben sind in

- Aktivierung von Carbonsäuren. Übersicht in Houben-Weyl, Methoden der Organischen Chemie, Band XV/2, Georg Thieme Verlag Stuttgart.
- Aktivierung mit Carbodiimiden. R. Schwyzer u. H. Kappler, Helv. <u>46</u>:1550 (1963)
- E. Wünsch et al., Ber. <u>100</u>:173 (1967)
- Aktivierung mit Carbodiimiden/Hydroxysuccinimid: J. Am. Chem. Soc. <u>86</u>: 1839 (1964) sowie J. Org. Chem. <u>53</u>: 3583 (1988). Synthesis 453 (1972).
- Anhydridmethode, 2-Ethoxy-1-ethoxycarbonyl-1,2-dihydrochinolin: B. Belleau et al., J. Am. Chem. Soc., 90:1651 (1986), H. Kunz et al., Int. J. Pept. Prot. Res., 26:493 (1985) und J.R. Voughn, Am. Soc. 73:3547 (1951).
- Imidazolin-Methode: B.F. Gisin, R.B. Menifield, D.C. Tosteon, Am. Soc. 91:2691 (1969).
  - Säurechlorid-Methoden, Thionylchlorid: Helv., 42:1653 (1959).

-8-

Oxalylchlorid: J. Org. Chem., <u>29</u>:843 (1964).

Im Falle der Umsetzung mit Verbindungen der allgemeinen Formel V worin X für Chlorid, Bromid, Iodid, Tosylat, Mesylat oder Triflat steht, erfolgt diese ebenfalls nach dem Fachmann bekannten Methoden s. z.B. Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Band XI/1, Georg Thieme Verlag.

Steht T für einen Acridin- oder Acridinderivat-Rest und X für ein Chlorid, so erfolgt die Umsetzung vorzugsweise wie in "The Chemistry of Heterocyclic Compounds" Vol. 9, Editor R.M. Acheson, John Wiles and sons, 1973 beschrieben.

Die für die oben beschriebenen Umsetzungen benötigten Ausgangssubstanzen sind literaturbekannt bzw. können analog literaturbekannten Methoden hergestellt werden.

II, s. DE 196 52 387,

5

15

IV s. DE 44 450 76,

III und V sind käuflich erwerbbar bzw. literaturbekannt.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel erfolgt ebenfalls in an sich bekannter Weise, indem man die erfindungsgemäßen Komplexverbindungen – gegebenenfalls unter Zugabe der in der Galenik üblichen Zusätze – in wäßrigem Medium suspendiert oder löst und anschließend die Suspension oder Lösung gegebenenfalls sterilisiert. Geeignete Zusätze sind beispielsweise physiologisch unbedenkliche Puffer (wie zum Beispiel Tromethamin), Zusätze von Komplexbildnern oder Komplexen (wie zum Beispiel von Diethylentriaminpentaessigsäure oder

die korrespondierenden makrozyclischen Ca-Komplexe) oder – falls erforderlich – Elektrolyte wie zum Beispiel Natriumchlorid oder – falls erforderlich – Antioxidantien wie zum Beispiel Ascorbinsäure.

Sind für die enterale Verabreichung oder andere Zwecke Suspensionen oder Lösungen der erfindungsgemäßen Mittel in Wasser oder physiologischer Salzlösung erwünscht, werden sie mit einem oder mehreren in der Galenik üblichen Hilfsstoff(en) [zum Beispiel Methylcellulose, Lactose, Mannit] und/oder

Tensid(en) [zum Beispiel Lecithine, Tween<sup>®</sup>, Myrj<sup>®</sup>] und/oder Aromastoff(en) zur Geschmackskorrektur [zum Beispiel ätherischen Ölen] gemischt. Prinzipiell ist es auch möglich, die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel auch ohne Isolierung der Komplexsalze herzustellen. In jedem Fall muß besondere Sorgfalt darauf verwendet werden, die Chelatbildung so vorzunehmen, daß die erfindungsgemäßen Salze und Salzlösungen praktisch frei sind von nicht komplexierten toxisch wirkenden Metallionen.

Dies kann beispielsweise mit Hilfe von Farbindikatoren wie Xylenolorange durch Kontrolltitrationen während des Herstellungsprozesses gewährleistet werden.

Die Erfindung betrifft daher auch Verfahren zur Herstellung der Komplexverbindungen und ihrer Salze. Als letzte Sicherheit bleibt eine Reinigung des isolierten Komplexsalzes.

Die erfindungsgemäßen pharmazeutischen Mittel enthalten vorzugsweise

1µMol-1Mol/I des Gadoliniumkomplexes und werden in der Regel in Mengen
von 0,0001-10mMol/kg dosiert. Sie sind zur enteralen und parenteralen
Applikation bestimmt.

Die erfindungsgemäßen Mittel erfüllen die vielfältigen Voraussetzungen für die Eignung als Mittel für die Neutroneneinfangtherapie und Photonenaktivierungstherapie. So zeigen sie die hohe Wirksamkeit, die notwendig ist, um den Körper mit möglichst geringen Mengen an Fremdstoffen zu belasten, und die gute

Verträglichkeit, die notwendig ist, um den nichtinvasiven Charakter der Untersuchungen aufrechtzuerhalten.

Die gute Wasserlöslichkeit und geringe Osmolalität der erfindungsgemäßen Mittel erlaubt es, hochkonzentrierte Lösungen herzustellen, damit die

-10-

Volumenbelastung des Kreislaufs in vertretbare Grenzen zu halten und die Verdünnung durch die Körperflüssigkeit auszugleichen ist. Weiterhin weisen die erfindungsgemäßen Mittel nicht nur eine hohe Stabilität in-vitro auf, sondern auch eine überraschende hohe Stabilität in-vivo, so daß eine Freigabe oder ein Austausch der in den Komplexen nicht kovalent gebundenen – an sich giftigen – Gadolinium-Ionen innerhalb der Zeit, in der die neuen therapeutischen Mittel vollständig wieder ausgeschieden werden, nur äußerst langsam erfolgt.

Die nachfolgenden Beispiele dienen zur Erläuterung des Erfindungsgegen10 stands.

-11-

#### Beispi 11

Gadolinium-Komplex von 10-[3-(2-Methoxy-6-chlor-acridin-9-yl)-2-hydroxypropyl]-1,4,7 tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (als Hydrochlorid)

10 g (35,95 mmol) 6,9-Dichlor-2-methoxyacridin werden zu 40 g (425 mmol)
Phenol gegeben und 1 Stunde auf 100°C erwärmt. Zu der so hergestellten
Schmelze gibt man eine Lösung bestehend aus 10,31 g (17,97 mmol) 10-[3Amino-2-hydroxy-propyl]-1,4,7,-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10tetraazacyclododecan-Gadoliniumkomplex, 3 g Lithiumchlorid in 60 ml Dimethylsulfoxid zu und rührt 5 Stunden bei 100°C. Man kühlt auf Raumtemperatur ab
und gibt die Lösung in eine Mischung aus 1000 ml Aceton/300 ml Diethylether.
Man rührt 30 Minuten, filtriert den ausgefallenen Feststoff ab und chromatographiert an Kieselgel (Laufmittel: Methanol/25 % aqu. Ammoniak = 30:1). Die
Fraktionen werden eingedampft, der Rückstand in Wasser gelöst und der pHWert durch Zugabe von 1 N aqu. Salzsäure auf pH 7,2 gebracht. Anschließend
wird gefriergetrocknet.

Ausbeute: 10,87 g (71 % d. Th.) eines gelben amorphen Feststoffs

20 Wassergehalt: 8,4 %

Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 43,71 H 4,61 N 9,87 Gd 18,46 CI 8,32

gef.: C 43,50 H 4,78 N 9,72 Gd 18,19 Cl 8,38

25

30

#### Beispiel 2

Folsäureamidkonjugat von Gadoliniumkomplex des 10-[3-Amino-2-hydroxypropyl]-1,4,7-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan

-12-

3,34 g (7,57 mmol) Folsäure werden über Nacht bei Raumtemperatur in 70 ml Dimethylsulfoxid gelöst. Man kühlt auf 15°C ab und gibt 1,480 g (7,18 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid und 0,87 g (7,56 mmol) N-Hydroxysuccinimid zu. Es wird 12 Stunden bei Raumtemperatur gerührt. Die so erhaltene Anhydridlösung wird im folgenden eingesetzt. Hierzu löst man 2,472 g (4,31 mmol) 10-[3-Amino-2-hydroxypropyl]-1,4,7-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan-Gadoliniumkomplex und 650 mg (15,33 mmol) Lithiumchlorid in 25 ml Dimethylsulfoxid und gibt die oben hergestellte Lösung zu. Außerdem gibt man noch 2,4 ml (29,75 mmol) Pyridin zu und rührt über Nacht bei Raumtemperatur.

Die Reaktionslösung wird in eine Mischung aus 1000 ml Diethylether/200 ml Aceton gegeben und 30 Minuten gerührt. Der ausgefallene Feststoff wird abfiltriert und in 50 ml Wasser gelöst. Der pH-Wert wird durch Zugabe von Eisessig auf pH 4 gestellt. Man filtriert vom ungelösten Harnstoff ab und lyophilysiert das Eluat. Das Lyophylisat wird in wenig Wasser gelöst und an RP-

18 chromatographiert (Gradient aus Wasser/Acetonitril/Tetrahydrofuran). Ausbeute: 4,30 g (72 % d. Th.) eines gelblichen Feststoffs

Wassergehalt: 7,5 %

Analyse (bezogen auf wasserfreie Substanz):

20 ber.: C 43,3.7 H 4,75 N 16,86 Gd 15,77

gef.: C 43,11 H 4,91 N 16,70 Gd 15,51

#### Beispiel 3

25

15

Amid-Konjugat von 3-Aminophenylboronsäure mit dem Gadoliniumkomplex von 1-[1-Methyl-2-oxo-3-aza-4-carboxy-butyl]-1,4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan (als Natrium-Salz)

1 g (1,588 mmol) des Gadoliniumkomplexes 1-[1-Methyl-2-oxo-3-aza-4-carboxy-butyl]-4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan,

-13-

134,6 mg (3,176 mmol) Lithiumchlorid und 365,8 mg (3,176 mmol) N-Hydroxysuccinimid werden in 10 ml Dimethylsulfoxid unter leichtem Erwärmen gelöst und anschließend auf 10°C abgekühlt. Man gibt bei 10°C 393 mg (1,906 mmol) Dicyclohexylcarbodiimid zu und rührt 45 Minuten bei Raumtemperatur. Zu der so hergestellten N-Hydroxysuccinimidesterlösung gibt man 246 mg (1,588 mmol) 3-Aminophenylboronsäure-Hydrat, gelöst in 5 ml Dimethylsulfoxid zu, anschließend 321,4 mg (3,176 mmol) Triethylamin. Man rührt über Nacht bei Raumtemperatur. Zu der erhaltenen Suspension tropft man 200 ml Aceton, filtriert den Niederschlag ab und wäscht ihn 2 mal mit etwas Aceton nach. Der Rückstand wird säulenchromatographisch gereinigt (RP-18/Laufmittel: Gradient aus Wasser/Acetonitril/Tetrahydrofuran). Das so erhaltene Produkt wird in Wasser gelöst und der pH-Wert mit aqu. 1 N Natronlauge auf pH 7,4 gestellt und anschließend gefriergetrocknet.

Ausbeute: 1,04 g (85 % d. Th.) farbloses, flockiges Pulver

15 Wassergehalt: 6,4 %

# Elementaranalyse (berechnet auf wasserfreie Substanz):

ber.: C 38,96 H 4,58 N 10,91Gd 20,41 B 1,40 Na 2,98 gef.: C 38,75 H 4,73 N 10,75Gd 20,20 B 1,36 Na 2,71

20

## Beispiel 4

Herstellung der Lösung

Eine Menge der Substanz nach Beispiel 2 wurde so abgewogen, daß sich nach Aufnahme mit 5 ml physiologischer NaCl-Lösung eine molare Konzentration von 50 mmol/l ergab. Die Lösung wurde auf pH 7 eingestellt und unter der Sterilbank in zuvor hitzesterilisierte Gefäße durch 0,2 μm Filter sterilfiltriert. Die Gd-Konzentration wurde über ICP-AES zu 49,8 mmol Gd/l bestimmt.

-14-

## Beispiel 5

U937 Zellen (histiozytische Lymphoma-Zellen humanen Ursprungs) wurden unter Normalbedingungen angezogen. Am Tag der Bestrahlung wurden aus einer Zellsuspension Zellen entnommen und auf die Meßproben aufgeteilt, so 5 daß alle Proben dieselbe Zellzahl enthielten. Zu den Proben wurde eine nach Beispiel 4 hergestellte Lösung (Stammlösung 50 mmol/l) pipettiert. Danach wurden die Zell-Lösungen eine Stunde bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Im Anschluß daran wurden die Lösungen in Quarzröhrchen mit thermischen Neutronen 1 h bestrahlt (Forschungsreaktor Hahn-Meitner-Institut Berlin, 10 Energie 0,009 eV, Fluß 1 109 n cm<sup>-2</sup> s°1). Nach Bestrahlung wurden die Zellen gewaschen in Normalmedium überführt und die Zelldichte über einen Zeitraum von ca. 200 h gemessen (Casy1). Aus der Auftragung der Zelldichte als Funktion der Zeit für die untersuchten Proben geht, wie man der Figur 1 entnimmt, hervor, daß die unbestrahlten 15 Kontrollen sich in ihrer Wachstumsgeschwindigkeit nicht unterscheiden. Die bestrahlten Proben zeigen verlangsamtes Zellwachstum derart, daß die reine Bestrahlung nur eine geringe Verlangsamung aufweist, die Zellen die in Anwesenheit der erfindungsgemäßen Verbindung aus Beispiel 4 bestrahlt wurden, aber deutlich langsamer wachsen, weil sie in ihrer Zellteilungsrate 20 durch die Neutronen-Einfang-Reaktion im Wachstum geschädigt sind.

#### Beispiel 6

25

30

Aus einer entsprechend Beispiel 4 hergestellten pharmazeutischen Lösung von Beispiel 3 (Bor-Gd-Konjugat) wurde zu den die U937 Zellen enthaltenden Proben soviel dazupipettiert, daß sich 2 und 5 mmolare Zell-Lösungen ergaben. Analog Beispiel 5 wurden die Zellen in Anwesenheit der Lösungen bestrahlt, im Anschluß daran gewaschen und über einen Zeitraum von ca. 200 h die

-15-

Zellproliferation verfolgt, in dem in regelmäßigen Zeitabständen die Zelldichte gemessen wurde.

Wie in Beispiel 5 sieht man , daß die Bestrahlung in Anwesenheit der Substanz die Zellproliferation konzentrationsabhängig hemmt (Figur 2).

5

5

## Patentansprüch

1. Verwendung von mindestens einer physiologisch verträglichen Verbindung der allgemeinen Formel I

worin

U für –CH₂-CH(OH)-CH₂-

oder

-CHR-CO-NH-(CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>-CO mit

R in der Bedeutung eines Wasserstoffatoms oder einer Methylgruppe und

n in der Bedeutung der Ziffern 1 bis 10, und

T für einen tumorspezifischen Rest biologischen oder synthetischen Ursprungs stehen,

für die Herstellung von Präparaten für die Neutroneneinfang- und Photonenaktivierungstherapie.

- 2. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß n für die Ziffer 1 steht.
- Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß T für ein(e)
  um eine Amino- oder Hydroxylgruppe vermindertes Hormon, Vitamin,
  Polysaccharid, Steroid, Lipid, Fettsäure, Peptid, Lektin, Nukleotid,
  Nukleosid, Antibiotikum, Antitumormittel, Porphyrinen und biogenes Amin
  oder deren Derivate steht.

25

10

15

4. Verwendung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß T für ein um ein Wasserstoffatom, eine Amino- oder Hydroxylgruppe verminderten(s)

15

25

35

Farbstoff, Antibiotikum, Antitumormittel, DNA-Interkalator, synthetisches Steroid und Phenylboronsäure oder deren Derivate steht.

- Verwendung nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß T für
   Progesteron, Estradiol, Biotin, Folsäure, Liponsäure, Ascorbinsäure, Vitamin
   K, Vitamin B12, Maltotetraose, Lewis-X, Chitosan, Cholesterin, Cholsäure,
   Phosphatidyl-bispalmitoyl-glycerin, Stearinsäure, Palmitinsäure,
   Somatostatin, VEGF, Doxorubicin, Adriamycin, Bleomycin, Taxol, Dientrien-Antibiotikum, Epothilon, Hämatoporphyrin, Mesoporphyrin, Spermidin,
   Tryptamin und Histamin steht.
  - Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß T für Methylblau, Acridin-Orange, Texaphyrin, Cephalosporin,, Carbacyclin, Cis-Platinderivate, Cyclophosphamid, Acridine, Psoralene, Cyproteronacetat, RU-486, Phenylalanin-4-boronsäure, Borcluster und Carboran steht.
  - 7. Verwendung gemäß Anspruch 1 zur Behandlung von Tumoren.
- 8. Pharmazeutische Mittel enthaltend mindestens eine physiologisch verträgliche Verbindung der allgemeinen Formel I nach Anspruch 1, gegebenenfalls mit den in der Galenik üblichen Zusätzen.
  - 9. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zubereitungen zusätzlich ein Antitumormittel enthalten.
  - Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß monochromatische Röntgenstrahlen verwendet werden.
- 30 11. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß 157Gadolinium verwendet wird.
  - 12. Gadolinium-Komplex von 10-[3-(2-Methoxy-6-chlor-acridin-9-yl)-2-hydroxypropyl]-1,4,7 tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan.
  - 13. Folsäureamidkonjugat vom Gadoliniumkomplex des 10-[3-Amino-2-hydroxypropyl]-1,4,7-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan.

14. Amid-Konjugat von 3-Aminophenylboronsäure mit dem Gadoliniumkomplex von 1-[1-Methyl-2-oxo-3-aza-4-carboxy-butyl]-1,4,7,10-tris(carboxymethyl)-1,4,7,10-tetraazacyclododecan.

Fig. 1

# U 937 Zellen Gd-Folsäure (Beispiel 2)1 h Neutronen

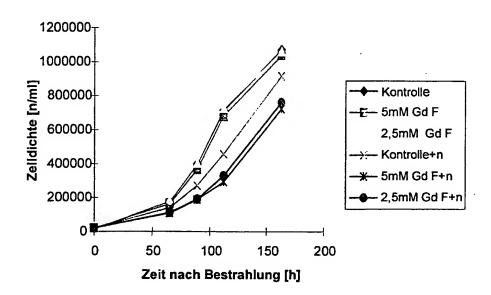


Fig. 2

